

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 03181853 A

(43) Date of publication of application: 07.08.91

(51) Int. Cl

G01N 33/543
G01N 27/416

(21) Application number: 01322886

(22) Date of filing: 12.12.89

(71) Applicant: KURARAY CO LTD

(72) Inventor: YAMADA HIDEAKI
TSURUTA HITOSHI
MATSUMOTO KEIKO
AKAMATSU YUKIKO
WATANABE TAKUICHIROU
MAKINO MASUO
NAKAMURA MICHICHIRO

**(54) CARTRIDGE FOR ENZYME IMMUNOASSAY AND
MEASURING METHOD AND APPARATUS USING
THE SAME**

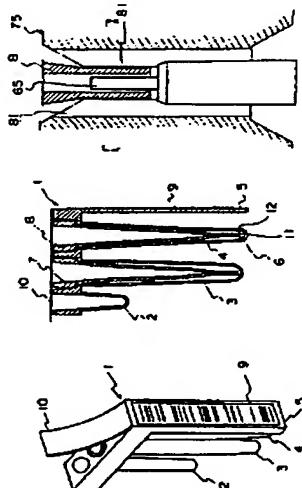
(57) Abstract:

PURPOSE: To automatically perform enzyme immunoassay using a pH electrode by providing a cartridge wherein a dilution cup in which a pipette chip-shaped dilution fine diameter tube is received and a reaction cup are integrally arranged.

CONSTITUTION: A specimen and a diluent are injected in a dilution cup 3 to prepare a specimen solution diluted in predetermined dilution magnification. Next, the leading end part of the fine diameter tube 8 for a solid phase received in a reaction cup 4 is immersed in the specimen solution in the dilution cup 3 to perform primary immunoreaction. Subsequently, a dissolving solution is injected in the reaction cup 4 to dissolve the freeze-dried enzyme labelled reagent of the reaction cup 4 and, thereafter, the leading end part of the fine diameter tube 8 after primary immunoreaction is immersed in the enzyme labelled reagent solution to perform secondary immunoreaction. Next, the fine diameter tube 8 after the secondary immunoreaction is washed. The washed fine diameter tube 8 is allowed to cover the responsive part of the pH electrode 65 provided in a measuring cell filled with a substrate solution and the

pH change accompanied by the decomposition reaction of the substrate solution between the fine diameter tube 8 and the responsive part of the pH electrode 65 is measured.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio



⑪ 公開特許公報 (A) 平3-181853

⑤Int.Cl.⁵
G 01 N 33/543
27/416
33/543

識別記号 V
X

厅内整理番号 7906-2G
7906-2G
6923-2G

⑪公開 平成3年(1991)8月7日

G 01 N 27/46 386 Z
審査請求 未請求 請求項の数 3 (全13頁)

⑩発明の名称 酵素免疫測定用カートリッジ、それを用いた測定方法及び測定装置

⑪特 願 平1-322886

⑪出 願 平1(1989)12月12日

⑩発明者	山 田 秀 明	岡山県倉敷市酒津2045番地の1	株式会社クラレ内
⑩発明者	鶴 田 仁 志	岡山県倉敷市酒津2045番地の1	株式会社クラレ内
⑩発明者	松 本 桂 子	岡山県倉敷市酒津2045番地の1	株式会社クラレ内
⑩発明者	赤 松 由 紀 子	岡山県倉敷市酒津2045番地の1	株式会社クラレ内
⑩発明者	渡 辺 拓 一 郎	岡山県岡山市海岸通1丁目2番1号	株式会社クラレ内
⑩発明者	楳 野 増 男	岡山県倉敷市酒津1621番地の1	株式会社クラレ内
⑩発明者	中 村 通 宏	岡山県倉敷市酒津2045番地の1	株式会社クラレ内
⑪出願人	株 式 会 社 ク ラ レ	岡山県倉敷市酒津1621番地	
⑪代理 人	弁理士 本 多 堅		

明細書

1. 発明の名称

酵素免疫測定用カートリッジ、それを用いた測定方法及び測定装置

2. 特許請求の範囲

1. 測定されるべき試料を収容するための試料カップと、ビペットチップ形状の希釈用細径管が収容された希釈カップ及び反応カップが一体に配列された酵素免疫測定用のカートリッジであって、該反応カップの底部に凍結乾燥された酵素標識試薬が収容され、かつ少くとも先端部内壁に測定対象物質たる抗原(または抗体)と結合する抗体(または抗原)が固定されたビペトチップ形状の固相用細径管が、該反応カップ内にその先端が酵素標識試薬から離間して収容されるとともに、上記各カップの上端開口がシール片で気密に閉塞されたことを特徴とする酵素免疫測定用カートリッジ。

2. 請求項1記載の酵素免疫測定用カートリッジを用いた酵素免疫測定方法であって、

(1) 希釈カップ内に収容されたビペットチップ形状の希釈用細径管で試料カップ内の試料および希釈液を希釈カップ内に注入し、該希釈カップ内で所定の倍率に希釈された試料液体を調製する工程。

(2) 反応カップ内に収容されたビペットチップ形状の固相用細径管の先端部を希釈カップ内の試料液体中に浸漬して1次免疫反応を行わせる工程。

(3) 反応カップ内に溶解液を注入して、該反応カップ内の凍結乾燥された酵素標識試薬を溶解させた後、該溶解させた酵素標識体溶液中に1次免疫反応が終了した固相用細径管の先端部を浸漬して2次免疫反応を行わせる工程。

(4) 2次免疫反応が終了した固相用細径管を洗浄する工程。

(5) 洗浄された固相用細径管を基質溶液が満たされた測定セル内に設けられたpH電極の感応部に被せて、該細径管とpH電極の感應部間ににおける基質溶液の分解反応に伴うpH変化を

測定する工程。

からなる酵素免疫測定方法。

3. 請求項1記載の酵素免疫測定用カートリッジを用いた酵素免疫測定装置であつて、

酵素免疫測定用カートリッジを操作ステーションへ供給する手段と、

該操作ステーションに設けられた、希釈波入口と溢流波出口を有する希釈波セルと、該希釈波セルへ希釈波を供給するポンプを備えた希釈ステーションと、洗浄波入口と溢流波出口を有する洗浄波セルと、該洗浄波セルへ洗浄波を供給するポンプを備えた洗浄ステーションと、基質溶液入口と溢流波出口を有し、かつ基質溶液の流通路にpH電極の感応部を露出させた測定セルと、該測定セルへ基質溶液を供給するポンプを備えた測定ステーションと、

該操作ステーションに供給されたカートリッジの希釈カップ及び反応カップ内に収容されたビベットチップ形状の希釈用細径管及び固相用細径管の上端開口に挿抜されるビベットヘッド

を一端に有し、他端にチューブを介してシリングが接続された分注手段と、

該ビベットヘッドを昇降させる手段と、

該昇降手段を水平方向に往復移動させる手段と、

該ビベットヘッドが挿抜された細径管の上端を押し下げて細径管を脱離させる手段とを備えた酵素免疫測定装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は免疫反応(抗原-抗体反応)を利用して生体試料(例えば血液、血清、血漿、尿、唾液など)のような多成分系に微量含まれる特定の物質を測定するのに適した酵素免疫測定用カートリッジ、それを用いた測定方法及び測定装置に関するものである。本発明は以下臨床検査における微量生体物質の測定について説明するが、薬学、生物学、動物学、植物学、農学、化学、検査等を取り扱う広い分野への適用が可能である。

(従来の技術)

生体の生理活性に関与する物質は既して微量であり、しかも生体に対して非常に重要な役割を演じるもののが少なくない。したがつて、このような微量の生理活性物質を定量的に測定することは医学、生化学等の生物関連分野にとって重要であり、そのための種々の測定方法が考案され、実用化されている。なかでも酵素を標識として用いる酵素免疫測定法が臨床検査分野で広く利用されている。

かかる測定法では、まず測定対象物質である抗原(または抗体)と特異的に結合し得る抗体(または抗原)を固定化した固相を試料溶液と酵素で標識された第2抗体(または抗原)と同時に、または逐次的に接触させて免疫反応を行なわせた後、洗浄し、かかる後に該固相上に残存している酵素標識体の活性を測定することによって試料溶液中の抗原(または抗体)の量を測定するものである。

かかる測定方法の代表例として不均一法ELISA、いわゆる Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) が知られている。

ELISAにおいては、試料溶液中の測定対象

物質を捕捉するために、測定対象抗原(または抗体)と特異的に結合する抗体(または抗原)を固定した固相として試験管、マイクロプレート等が用いられる。それに加えて測定対象が抗原の場合、サンドイッチ法ELISAにおいては該抗原に結合し得る第2抗体に酵素を標識した酵素標識第2抗体が、また競合法ELISAにおいては測定対象抗原と同一の抗原に酵素を標識した酵素標識抗原が用いられる。

上記標識として用いられる酵素に対する基質溶液と、そしてさらに必要ならば発色試薬を固相と接触させる。すると基質溶液の分解反応に伴ない基質溶液の光学的性質が変化するので、その変化を観察する。

基質溶液の光学的性質の変化を観察するには、従来からいくつかの方法が知られている。そのうち機器を用いる方法としては、吸光光度計、蛍光光度計、化学発光光度計などで基質溶液の光学的性質の変化を測定するものである(例えば、石川河合、宮井、酵素免疫測定法、医学院(1982))

参照)。

また、他の方法として基質溶液と対照基質溶液を対比させて基質溶液の色の違いを肉眼で観察して抗原(または抗体)の存在を判定するものがある(例えば特開昭60-128269号参照)。

しかしながら機器を用いたこれらの光学的測定法は安定な光源、高感度の光度計、精密な光学系増幅回路等を要するために、高価で、大型の複雑な装置にならざるを得なかつた。また測定するに当り、特殊な技術を必要とするため取扱いのための専門の技術者を配置しなければならなかつた。

一方肉眼で直接観察する方法は、定性的な測定方法であり、色の変化のバラツキや観察者の主観が入るので判定に個人差が生じやすい。さらに、医く微量の物質の測定の場合には色の変化が少なく判定が困難であつた。

本発明者らは、かかる従来の測定方法のもつ欠点を改良し、観察者の主観による判定基準の曇昧さを除去して、基質溶液の分解反応を客観的に、しかも高い検出精度で測定する方法として基質溶

液のpH変化をpH電極で測定する方法を特開平1-212347号に提案した。

(発明が解決しようとする課題)

かかる測定方法においては、通常pH電極としてpH感応性電界効果トランジスタ(pH-FET)、固相としてピベットチップ形状の細径管の先端部内壁、標識酵素としてウレアーゼ、また基質として尿素が用いられる。

pH電極を用いる酵素免疫測定法は、(1)pH電極が従来の光学的測定系に比べて構造がきわめて簡単である。(2)固相としてピベットチップ形状の細径管を用いるので試料の希釈から洗浄までのすべての操作を分注手段で行うことができるなどの利点があるが、上記提案ではpH電極を利用した実験室規模の酵素免疫測定方法及び装置を提案したにとどまり、実用的な測定方法及び装置は未だ提案されていない。

したがつて本発明の目的はpH電極を用いて酵素免疫測定を自動的に行う実用的な方法及び装置を提供することである。

さらに上記測定方法及び装置を用いると各種感染症の抗原や抗体、各種ホルモン、各種ガンマーカ、各種薬物等多數を測定することができる。しかも一般に酵素免疫測定法においては、固相、酵素標識体、基質、希釈用緩衝液(以下希釈液と略記する)、洗浄用緩衝液(以下洗浄液と略記する)等多くの試薬が用いられる。これらの試薬のうちいくつかは測定項目毎に異なるために、従来はこれらの試薬は一つのキットとしてまとめた形態で販売してきた。すなわちユーザは測定項目が変わることに専用のキットを取りだし、既定の手順で測定を行うことになる。一般的にキットのサイズは数十ないし数百検体分であり、数十ないし数百検度の検体をまとめて1項目測定するには適しているが、任意の測定項目を任意の順序で測定するには不適当であつた。

したがつて本発明の他の目的は測定項目:検体分の専用試薬その他をカートリッジ化することにより、任意の測定項目を任意の順序で測定することを可能とした酵素免疫測定用カートリッジを提

供することである。

(課題を解決するための手段)

本発明は測定されるべき試料を収容するための試料カップと、ピベットチップ形状の希釈液用細径管が収容された希釈液カップ及び反応カップが一体に配列された酵素免疫測定用のカートリッジであつて、該反応カップの底部に凍結乾燥させた酵素標識試薬が収容され、かつ少くとも先端部内壁に測定対象物質たる抗原(または抗体)と結合する抗体(または抗原)が固定されたピベットチップ形状の固相用細径管が、該反応カップ内にその先端が酵素標識試薬から離間して収容されるとともに、上記各カップの上端開口がシール片で気密に閉塞されたことを特徴とする酵素免疫測定用カートリッジである。

また本発明は上記酵素免疫測定用カートリッジを用いた酵素免疫測定方法であつて、

(1) 希釈液カップ内に収容されたピベットチップ形状の液用細径管で試料カップ内のは試料および希釈液を希釈液カップ内に注入し、該希釈液カップ内

で所定の倍率に希釈された試料液体を調製する工程。

(2) 反応カップ内に収容されたピベットチップ形状の固相用細径管の先端部を希釈カップ内の試料液体中に浸漬して1次免疫反応を行わせる工程。

(3) 反応カップ内に溶解浴液を注入して、該反応カップ内の凍結乾燥された酵素標識試薬を溶解させた後、該溶解させた酵素標識体浴液中に1次免疫反応が終了した固相用細径管の先端部を浸漬して2次免疫反応を行わせる工程。

(4) 2次免疫反応が終了した固相用細径管を洗浄する工程。

(5) 洗浄された固相用細径管を基質浴液で満たされた測定セル内に設けられたpH電極の感応部に被せて、該細径管とpH電極の感応部間ににおける基質浴液の分解反応に伴うpH変化を測定する工程。

からなる酵素免疫測定方法である。

さらに本発明は上記酵素免疫測定用カートリッジを用いた酵素免疫測定装置であつて、

酵素免疫測定用カートリッジを操作ステーションへ供給する手段と、

該操作ステーションに設けられた、希釈波入口と溢流波出口を有する希釈波セルと、該希釈波セルへ希釈波を供給するポンプを備えた希釈ステーションと、洗浄波入口と溢流波出口を有する洗浄波セルと、該洗浄波セルへ洗浄波を供給するポンプを備えた洗浄ステーションと、基質浴液入口と溢流波出口を有し、かつ基質浴液の流通路にpH電極の感応部を露出させた測定セルと、該測定セルへ基質浴液を供給するポンプを備えた測定ステーションと、

該操作ステーションに供給されたカートリッジの希釈カップ及び反応カップ内に収容されたピベットチップ形状の希釈用細径管及び固相用細径管の上端開口に挿嵌されるピベットヘッドを一端に有し、他端にチューブを介してシリンドが接続された分注手段と、

該ピベットヘッドを昇降させる手段と、

該昇降手段を水平方向に往復移動させる手段と、

該ピベットヘッドが挿嵌された細径管の上端を押し下げる細径管を脱離させる手段とを備えた酵素免疫測定装置である。

(実施例)

本発明の酵素免疫測定用カートリッジの一例を図面にて説明する。第1図はカートリッジの斜視図であり、第2図は断面図である。該カートリッジ(1)は試料カップ(2)、希釈カップ(3)及び反応カップ(4)で構成され、希釈カップ(3)及び反応カップ(4)内にはそれぞれピベットチップ形状の希釈用細径管(7)及び固相用細径管(8)が収容されている。またカートリッジの側壁(5)には測定項目を表示するバーコードラベル(9)が貼着されている。さらに上記各カップ(2)、(3)、(4)の上端開口にはシール片(10)が貼着されて、各カップを気密に閉塞している。第2図に示すように反応カップ(4)の底部には凍結乾燥された標識抗体(または標識抗原)(6)が収納されている。また反応カップ内に収容された固相用細径管(8)の先端部内壁(11)には抗体(または抗原)が固定化されてい

る。

本発明のカートリッジは一体成形することが好ましく、その材質としてはポリプロピレン、ポリステレン、ポリ塩化ビニル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレン、ポリカーボネイト、ポリアミド、ポリエスチル等、各種のプラスチックが用いられる。3つのカップの上端開口は一枚のシール片(10)で閉塞することが望ましいので、各カップの上端開口は同一平面とすることが好ましい。シール片(10)は特に固相用細径管と凍結乾燥された酵素標識体を乾燥状態に保存するためのものであるので、アルミニウムラミネートフィルムのような通気性の低い材料が用いられる。また希釈用細径管(7)および固相用細径管(8)の材質はガラス等を使用してもよいが通常上記のカートリッジ成形用に列記した樹脂のいずれかが使用される。

試料カップ(2)は試料液体をその中に仕込むためのものである。必要な試料液体の容積は通常200μl以下であるから、試料カップの内容積とし

ては20~500㎕が好ましい。希釈カップ(3)はその中で前記の試料液体を所定の倍率に希釈するためのものである。この希釈操作には希釈カップ(3)内に収容されている希釈用細径管(1)が用いられる。希釈操作に用いられた希釈用細径管(1)は直ちに廃棄される。希釈用細径管(1)をこのように使い捨てにすることにより、それを共用にした時に生じる、いわゆるキャリーオーバーを防ぐことができる。希釈カップ(3)はまたその中で固相用細径管(8)と希釈試料液体との間の第一次免疫反応を行うためにも使用される。希釈カップ(3)の内容液としては通常0.5~2.0㎖が好ましい。反応カップ(4)中には固相用細径管(8)と凍結乾燥した酵素標識体(6)が収納されているが、固相用細径管(8)は上記のように、まず希釈カップ(3)の中で第一次免疫反応を行うために使用される。また、溶解溶波、例えば共通試薬の希釈波または洗浄波を吸引して反応カップに注入して反応カップ(4)中の凍結乾燥標識体(6)を溶解するためにも使用される。その後該細径管(8)の先端部は溶解され

た標識体溶液中に浸漬されて第二次免疫反応に供される。反応カップ(4)の内容液は希釈カップ(3)と同様に0.5~2.0㎖が好ましい。溶解前の凍結乾燥酵素標識体(6)は反応カップ(4)の中に固相用細径管(8)と共に収容されるが、その時標識体(6)と固相用細径管(8)は絶対に接触してはならない。そのために、凍結乾燥標識体(6)は反応カップ(4)の底部に収納され、固相用細径管(8)はその上部に離間して収容される。

しかし、凍結乾燥標識体(6)を少量の溶解溶波、例えば希釈波で再溶解した時に標識体溶液中に固相用細径管の先端部を浸漬する必要があるので、離間させた凍結乾燥標識体(6)の上面と固相用細径管(8)の先端部の距離は可能な限り短くすることが望ましい。通常その距離は0.2~2mm程度である。このような位置に凍結乾燥標識体を保持するために第2図で示されるように反応カップ(4)の底部付近にしづり部(12)を設けることが好ましい。

本発明の酵素免疫測定用のカートリッジは測定項目固有の試薬としての固相用細径管と酵素標識

体、および測定項目を表示するバーコードと一緒に体の測定を行うに必要な使い捨て品としての試料カップ、希釈カップ、反応カップ、希釈用細径管を備えている。したがって、使用者は該カートリッジの試料カップの中に試料液体を入れて、それを後述する装置に装着するのみで測定が自動的に行われる。

次に上記酵素免疫測定用カートリッジを使用した酵素免疫測定装置の一実施例を図面にて説明する。第3図は本発明装置の正面図、第4図は平面図、第5図は本発明装置の基本構成を示す概略図である。

本発明の酵素免疫測定装置は、上記カートリッジ(1)を希釈ステーション(B)、洗浄ステーション(C)及び測定ステーション(D)がこの順序で配列された操作ステーション(A)へ供給する手段と、該操作ステーションにおいて、ピベットトップ形状の希釈用細径管(1)及び固相用細径管(8)の上端開口に挿入されるピベットヘッド(28)を介して細径管内へ液体を吸引または細径管内に吸引された液

体を吐出する分注手段(E)と、該ピベットヘッド(28)を昇降させて細径管を各カップに挿入させる昇降手段(F)と、該昇降手段を水平方向へ往復移動させる往復移動手段(G)と、ピベットヘッドに挿入された細径管を脱離させる手段(H)を備えている。

カートリッジ供給手段はカートリッジ(1)を操作ステーション(A)へ供給するもので、通常カートリッジを円周に沿って移動させるターンテーブル機構やカートリッジを直線的に移動させるコンベア機構等が採用される。第3図~第5図ではコンベア機構(31)を使用した例を示している。また操作ステーション(A)内をカートリッジが移動する間に反応カップの中で免疫反応がおこなわれる。免疫反応は室温で行われることもあるが、通常は一定温度、たとえば37℃で行なわれるため、カートリッジ移動中にカートリッジを一定温度に保持させることが好ましい。そのため第4図に示すようにコンベア(31)をヒーティングブロック(29)上に張設したり、またコンベア機構(31)を密閉部材

で被覆して、その中に加温された空気を供給してカートリッジ周囲を37°Cに保持してもよい。

上記コンベア機構には、例えば一定間隔にカートリッジ把持機構(31)が設けられて、該把持機構でカートリッジの両側端が把持され、コンベアの移動により間欠的または連続的にカートリッジを移動させる。操作ステーション(1)で測定が終了したカートリッジ(1)はその時点で把持機構(30)が解除されてコンベア機構(31)の端部に設けられたカートリッジの廃棄容器(19)に排出される。

コンベア機構(31)の操作ステーション入口にはカートリッジの側壁に貼着されたバーコードラベル(9)を読み取るバーコードリーダ(32)が設けられ、操作ステーションに供給されるカートリッジのバーコードを読み取る。

操作ステーション(1)には該ステーションの入口側から順に希釈ステーション(B)と洗浄ステーション(C)及び測定ステーション(D)が配置されている。

希釈ステーション(B)には上面に設けられた溝

流液出口を有し、かつ基質溶液の流通路に感応部を露出させたpH電極(18)が収容された測定セル(33)が設けられている。基質溶液は洗浄液と尿素原液を各に洗浄液容器(43)と尿素原液容器(42)からポンプ(18)によってミキサ(34)に供給し、該ミキサ(34)で混合することによって調製され、その後測定セル(33)に供給される。該測定セルから溢流した溢流液は溢流液出口からポンプ(41)によって廃液容器(45)に排出される。

尿素基質溶液としては、濃厚原液を希釈して用いる方式と、すでに希釈された尿素基質溶液を用いる方法があるが、すでに希釈された基質溶液を用いるときにポンプ(18)は尿素基質溶液のみを送ることとなり、ミキサ(34)は不要となる。

第6図は測定セルの詳細断面図であり、該セルは金属製のプロフク(60)からなり、セルの下部側壁に基質溶液の入口(61)、該入口と連通する測定室(62)、測定室(62)の上部に設けられた基質溶液溢流口(63)、および該セルからの基質溶液出口(64)を備えた基質溶液流路を形成している。この

の一端に開口する希釈液入口と他端に開口する溢流液出口を有する希釈液セル(36)が設けられている。希釈液は容器(44)からポンプ(40)によって希釈液セル(36)に供給され、該セルの上面に設けられた溝から溢流し、溢流液出口から後述する洗浄液及び基質溶液とともにポンプ(41)によって廃液容器(45)に排出される。

洗浄ステーション(C)には上記希釈液セル(36)と同一形状の洗浄液セル(35)が設けられている。洗浄液は洗浄液容器(43)からポンプ(39)によって洗浄液セル(35)に供給され、該セルの上面に設けられた溝から溢流し、溢流液出口からポンプ(41)によって廃液容器(45)に排出される。

試料希釈液および洗浄液を所定温度例えば37°Cで使用する場合、洗浄液セル(35)および希釈液セル(36)を恒温化する必要があるが、その場合にはこれらのセルを恒温ヒートプロックとすることが好ましい。かかるセル(35)、(36)には通常アルミニウムなどの金属が用いられる。

測定ステーション(D)には基質溶液の入口と溢

測定室(62)にはpH電極(65)がその感応部が基質溶液の流路に露出するように収容されている。

金属製プロフクからなる測定セル(60)は基質溶液(通常尿素が用いられる。)に対して耐腐蝕性を有するもので通常チタン、ニッケルが好ましく用いられる。アルミニウムなどを用いる場合には基質溶液との接触面を耐腐蝕性樹脂でコーティングする必要がある。またpH測定を一定の温度で行う場合には金属製プロフク(60)に伝熱線を収容するための開孔(90)を穿設し、この開孔に伝熱線(91)を収容して、該プロフクを一定の温度に加温する。

測定室(62)内に収容されるpH電極(65)としては従来から最も多用されているいわゆるガラス電極の他に、pH感応性電界効果トランジスタ(以下pH-FETという)、酸化パラジウム/パラジウムワイヤ等の表面酸化金属膜タイプのpH電極、プロトン受容体を含有するポリ塩化ビニルから成るpH感応性高分子膜を金属膜や炭素膜にコートしたコーティドワイヤ型のpH電極等、各種

の微小pH電極を用いることができる。しかしながらガラス電極型のpH電極は、細径化すると誘導ノイズが増大する傾向がある。表面酸化金属線型pH電極は細径化が容易であるが、長期の水中寿命等に難点がある。コーティドワイヤ型のpH電極も細径化が容易であるが、pH変化に対する直線応答域が狭い、水中寿命が短いなどの難点がある。そのためこれらのpH電極を使用する場合には上記問題点を予め解消しておく必要がある。

それに対してpH-FETは(1)細径化が容易である。(2)細径化した時の誘導ノイズが少ない、(3)IC技術で製造するので、電極間の特性のバラつきが小さくでき、かつpH感応面(ゲート部)を微小化することができる。(4)pH変化に対する応答が極めて速く、かつ応答曲線にヒステリシスが残らない、(5)pH変化に対する直線応答域が広い、(6)水中の保存寿命が半永久的で、かつpH感度等の特性の経時変化が少ない、(7)温度検出用のダイオードを基板に取り付けることができる等の優れた特徴を有しているので測定室(62)

内に収容されるpH電極として最適である。第6図はpH-FETを使用した例を示している。pH-FET(65)は外筒(66)の先端にpH-FETの感応部を突出させ、電極に連結させたリード線を外筒の他端に延在させ、pH-FETの電極部と外筒内壁間に樹脂を封入し、かつ外筒を閉塞している。さらに、該外筒(66)と比較電極(67)とをより太い外筒(68)に挿通し、先端を樹脂で閉塞している。この太い外筒(68)は端部にコネクタ部(71)を設けたハウジング(69)内に挿入され、該ハウジング内壁と外筒(68)及び比較電極(67)間は樹脂が封入されている。コネクタ部(71)にはリード線接続用のピンが納められており、これにすくなくともpH-FETのソース、ドレイン、および比較電極の3本のリード線が接続される。pH-FET(65)は外筒(66)にチップカプラ(75)を挿入した後、電極最外筒に設けられたネジ部(72)によってセル(60)の測定室(62)の中に挿入され、O-リング(73)とおさえネジ(74)によって所定の位置に固定される。pH測定時には固相用細径管(8)

が測定セルの上部から測定室内に挿入され、チップカプラ(75)に導かれてpH-FET(65)に被せられる。

チップカプラ(75)は固相用細径管(8)をpH-FET(65)に被せるためのガイドとしての役割を有している。該チップカプラは第7図及び第8図(第7図のA-A矢視図)に示すように固相用細径管(8)のガイドとしての中空部(80)の周囲にクローバー状の基質溶液流路を形成する4ヶの空洞(81)が設けられている。

細径管内への液体の吸引または細径管内の液体を吐出せる分注手段(8)は細径管の上端開口に挿入されるビペットヘッド(28)と該ビペットヘッドの端部にチューブ(26)を介して接続されたシリング(25)で構成されている。(21)はチューブ(26)の分歧に取られたチューブ開閉弁である。

該ビペットヘッド(28)はカップ内に細径管を挿入させる、例えばシリングなどからなる昇降手段(F)に連結されて該昇降手段の作動と連動して昇降する。該昇降手段(F)はさらに水平方向移動手

段(G)、例えばX軸駆動アーム(22)に連結されてX方向に往復移動される。また必要であれば該X軸駆動アームをY軸駆動アーム(21)に連結するとY方向に往復移動させることができる。

また昇降手段(F)には第9図に示すようにビペットヘッド(28)に挿入された細径管の上端を下方へ押圧して細径管をビペットヘッド(28)から脱離させる手段(H)が設けられている。(31)は希釈操作の終了した希釈用細径管を廃棄するための容器である。

第10図は本発明装置の制御回路図であり、上記各部の作動はコンピュータによって制御される。pH電極出力から測定対象物質の濃度への変換のためのデータ処理もコンピュータによって行われ、その結果はディスプレーもしくはプリンタまたはその両者に表示される。

またpH電極としてpH-FETを使用する場合にはその出力の読み取りとして特開昭60-14851号、同60-225056号などに記載されたソースフォロワ型の測定回路が用いられる。

次に本発明のカートリッジを用いた酵素免疫測定方法について、2ステップサンドイッチ法の場合について説明する。下記の説明において固相用細径管には測定対象抗原（または抗体）を捕獲するための抗体（または抗原）が固定化されている。また凍結乾燥標識体としては測定対象物質をサンドイッチするための標識抗体（または標識抗原）が用いられる。ユーザは所望の測定項目用のカートリッジを取りだし、カートリッジの上面に貼着されたシール片（10）をはがし、試料カップ（2）の中に20μl程度の試料液体を入れ、これをカートリッジ供給用のコンベア機構（31）にセットすると第10図に示す測定回路によって以下の各操作が全て自動的に行われる。

① 上記コンベアによりカートリッジ（1）が操作ステーション（A）へ供給されるとまずバーコードリーダ（32）がバーコード（9）から測定項目等を読み取り、それに応じた操作プログラムや検量線が選択される。

② 次はカートリッジが希釈ステーション（B）に

送られると昇降手段が作動してビベットヘッド（28）が希釈カップ（3）内の希釈用細径管（7）を接着して試料カップ（2）内の試料溶液を所定量（例えば10μl）吸引し、直ちに希釈液セル（38）に移動して、所定量の希釈液（例えば90μl）を追加吸引する。次いでビベットヘッドが希釈カップ（3）に戻り、その中に試料と希釈液の混合溶液（例えば100μl）を吐出し、さらにその液の再吸引－再吐出を繰り返して試料と希釈液との混合することにより所定の倍率に（例えば10倍）希釈された試料溶液を調製する。上記希釈用細径管は容器（37）に固定される。

③ 次にビベットヘッド（28）が反応カップ（4）内の固相用細径管（8）を接着し、これを希釈カップ（3）内の希釈試料液の中に挿入して所定量（例えば10μl）の希釈試料液を吸引した後、該細径管（8）を希釈カップ（3）内に離脱静置させ、この状態で所定時間（例えば10分間）一次免疫反応を行う。

④ 一次免疫反応を終えるとカートリッジを洗浄ステーション（B）へ移動させる。そして該ステ

ーションでビベットヘッドが固相用細径管を再接着し、これを希釈液セル（38）に移動し、該セルの上面に設けられた溝をオーバーフローしている希釈液を数回吸引－吐出して該細径管を洗浄する。その後所定量（例えば20μl）の希釈液を吸引し、ビベットヘッドをカートリッジの反応カップ（4）に移動し、その中に吸引した希釈液を吐出して凍結乾燥された標識体（6）を溶解させる。標識体をより完全に溶解するために、反応カップ内で溶解した標識体溶液を数回吸引－吐出して完全に溶解させた後、固相細径管（8）を反応カップ（4）内に離脱静置させ、この状態で所定時間（例えば5分間）第二次免疫反応を行った後、カートリッジを測定ステーション（C）へ移動させる。

⑤ 第二次免疫反応を終えた固相用細径管（8）をビベットヘッドに再接着し、これを洗浄液セル（35）に移動し、該セルの上面に設けられた溝をオーバーフローしている液を数回吸引－吐出して、該細径管を洗浄する。その後該細径管を測定セル（33）に設けられた測定室内に挿入し、該測定セ

ル内を流通する尿素基質溶液を吸引した後、pH-FETに被せ、該細径管とpH-FETの間に封入された基質溶液のpH変化を測定する。

pH変化測定中に、チューブ（26）の温度が変化すると、チューブ内の空気の体積が変化し、これがpH-FETと細径管で形成される間隙に封入された基質溶液の流动を誘起し、測定誤差を生じる恐れがある。そのためpH変化測定中にチューブ開閉弁（27）を開いて、チューブ内の圧力を大気圧に解放することが好ましい。

pH変化はpH-FETのソース電位の変化とし読み取られる。そして、通常細径管がpH-FETに被せられた後数十秒間のいずれかの時間帯における、ソース電位の変化速度が算出され、その変化速度があらかじめ求められた換算式によって測定対象物質の濃度に換算表示される。

本発明のカートリッジ、それを用いた測定方法及び装置はサンドイッチ法および競合法の酵素免疫測定に使用できる。また本発明はいわゆる2ステップサンドイッチ法および2ステップ競合法に

ついて説明しているが、原理的には1ステップのサンドイッチ法および1ステップの競合法にも適用することが可能である。これら1ステップ法を用することが可能である。これら1ステップ法を採用する際には、測定対象物質の濃度が極端に高くなつたときに検出出力がかえつて低下すると言う、いわゆるプロゾーン現象を防止するようなアッセイ条件を設定する必要がある。

(発明の効果)

以上述べてきたように本発明の酵素免疫測定用のカートリッジ、それを用いた測定方法及び装置は

(1) 任意の測定項目を任意の順序で測定することができるため少數の検体でも試薬のロスなく、中小規模病院での検査にも応用できる。

(2) 簡単なハードウェアで完全自動化を行うことができる。

といった特徴の他にさらに、

(3) ピベットチップ形状の細径管の先端細径部と言う微少な領域で免疫反応および酵素反応を行

わせるので、それぞれの反応が極めて速やかであり、反応時間が短くて、また使用する試料液体の量もわずかでよい。

(4) 酵素免疫測定方法においては、一般に固相用細径管の洗浄が重要で結合体／遊離体分離と称されているが本発明では、これを分注手段によって行うので洗浄用の特殊な駆動部を必要としない。

という優れた効果を有している。

実験例1

本発明の酵素免疫測定用カートリッジを、第3図に示す測定装置に適用して、アルファアフェトプロテイン(AFP)の測定を行つた。この場合、固相用細径管には抗 AFP 抗体を固定し、反応カップの底部に抗 AFP 抗体のウレアーゼ標識体の凍結乾燥体を収納した。

また測定項目によらない共通試薬としては次のものが用いられた。

希釈液 : 0.0915M リン酸水素 2 ナトリウム +
0.0085M リン酸ナトリウム (pH 7.8)

洗浄液 : 0.1M 塩化アンモニウム + 0.154M 塩化ナトリウム

基質液 : 0.1M 塩化アンモニウム + 0.154M 塩化ナトリウム + 0.1M 尿素

AFP 測定用のカートリッジを取り出し、シール片を開いた後、その試料カップの中に 20 μl の血清試料を入れた。次に該カートリッジを測定装置に装着し以下の順序で測定を行つた。

a) 分注器が、希釈カップの中に収納されている希釈用細径管を装着し、試料カップ中の試料を 10 μl と希釈液セルの希釈液 90 μl とを吸引し、これを希釈カップ中に吐出し、10倍希釈された試料溶液を調製した。その後希釈用細径管は廃棄用ボトルの中に廃棄された。

b) 分注手段により、反応カップ中に収納されている固相用細径管を装着し、これを上記 10 倍希釈試料溶液の中に離脱することにより、第 1 次免疫反応が開始された。その後この状態で希釈カップ内の細径管は 37 ℃ で 10 分間温育された。次いで再び分注手段が、該細径管を装着して、これを希

駆波セルに移動し、希釈液を吸引 - 吐出することにより洗浄がおこなわれた。

c) 分注手段が固相用細径管を装着したまま、該希釈液を 30 μl 吸引し、これを反応カップ中に吐出し、吸引 - 吐出をくりかえすことにより該カップ底部にある凍結乾燥標識体を溶解した。その後該チップを該カップ中に離脱することにより、第 2 免疫反応が開始された。この状態でカップ内のチップは 37 ℃ で 5 分間温育された。

d) 分注手段が該固相用細径管を再装着し、該細径管を洗浄液セルに移動させ、そこで洗浄液を吸引 - 吐出することにより該細径管を洗浄し、洗浄液を吐出した後、細径管を pH 測定セルの中に挿入しながら、基質溶液(尿素および塩化アンモニウム溶液) を細径管中に吸引した。次いで pH 測定セルの中に細径管を収納して、該細径管の先端を pH - FET に接せた。

e) pH - FET の出力(ソース電位) を 20 秒間読み取り、測定開始後 10 秒から 20 秒の間 10 秒間の出力の変化速度の平均値を求めた。

1) pH測定セルの中に基質溶液をポンプで10秒間送入してセル内の基質溶液を新鮮なものに置換し、次の測定に備えた。

このようにして測定されたpH-FETの出力の変化速度とAFPの濃度との関係を表1に示した。

表 - 1

AFP濃度 (ng/ml)	pH-FET 出力変化速度 (mV/sec)
0	0.024
3.9	0.080
7.9	0.149
15.6	0.245
31.3	0.445
62.5	0.768
125.0	1.484
250.0	2.568
500.0	4.065
1000.0	6.676

実験例2

実験例1と同様にしてフェリチンの測定を行つ

A抗体を固定し、反応カップには抗CEA抗体のウレアーゼ標識体の凍結乾燥体を収納し、以下の順序で測定を行つた。

a) 分注手段が希釈カップ中に収納された希釈用細径管を装着し、試料カップ中の血清試料10μlと希釈液20μlとを吸引し、これを希釈カップに吐出し、3倍希釈された試料溶液を調製した。その後希釈用細径管は廃棄された。

以下実験例1のb)～e)と同様の操作を行つた結果を表-3に示した。

以下余白

た。この場合固相用細径管には抗フェリチン抗体を固定し、反応カップの底部に抗フェリチン抗体のウレアーゼ標識体の凍結乾燥体を収納した。

実験例1と全く同様の操作手順で測定を行つた結果を表2に示した。

表 - 2

フェリチン濃度 (ng/ml)	pH-FET 出力変化速度 (mV/sec)
0.0	0.005
3.9	0.021
7.9	0.031
15.6	0.103
31.3	0.175
62.5	0.488
125.0	0.879
250.0	1.737
500.0	3.331
1000.0	6.509

実験例3

実験例1と同様に、癌胎児性抗原(CEA)の測定を行つた。この場合固相用細径管には抗CE

表 - 3

CEA濃度 (ng/ml)	pH-FET 出力変化速度 (mV/sec)
0.0	0.007
1.25	0.128
2.5	0.255
5.0	0.510
10.0	0.995
20.0	1.916
40.0	3.436
80.0	5.918
160.0	9.375
320.0	14.405

4. 図面の簡単な説明

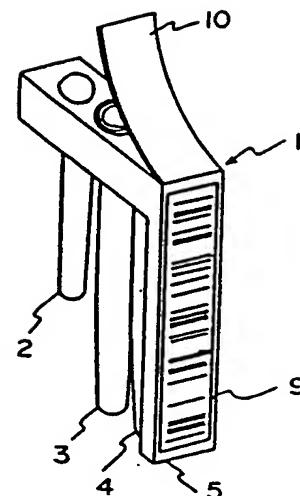
第1図は本発明の酵素免疫測定用カートリッジの斜視図であり、第2図は該カートリッジの断面図である。第3図は本発明の測定装置の正面図であり、第4図は平面図であり、第5図は本発明装置の基本構成を示す概略図であり、第6図は測定セルの詳細構造を示す断面図であり、第7図はカップラの構造を示す断面図であり、第8図は

第7図のA-A矢視図であり、第9図は昇降手段を示す正面図であり、第10図は本発明装置の制御回路図である。

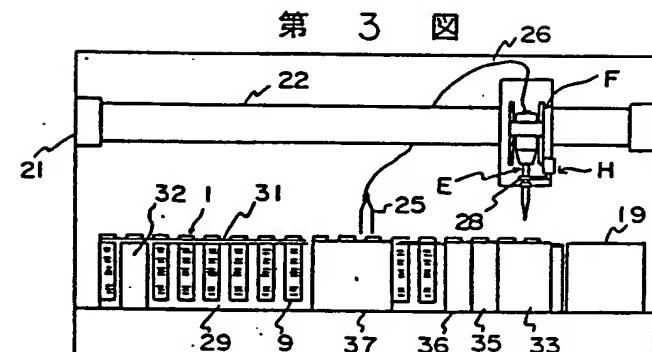
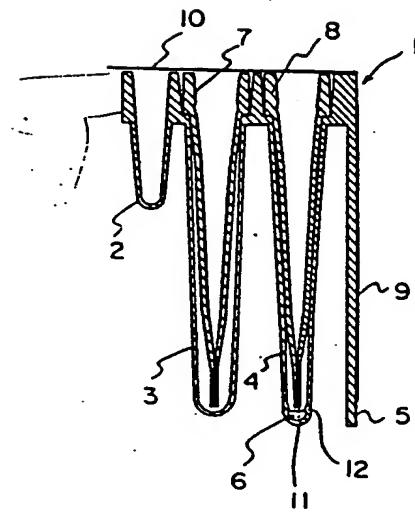
第1図

- A …… 操作ステーション
- B …… 希釈ステーション
- C …… 洗浄ステーション
- D …… 測定ステーション
- E …… 分注手段、F …… 昇降手段
- G …… 往復移動手段、H …… 脱離手段
- 1 …… カートリッジ、2 …… 試料カップ
- 3 …… 希釈カップ、4 …… 反応カップ
- 6 …… 凍結乾燥標準体
- 7 …… 希釈用細径管、8 …… 固相用細径管
- 10 …… シール片、33 …… 測定セル
- 35 …… 洗浄セル、16 …… 希釈セル
- 65 …… pH電極

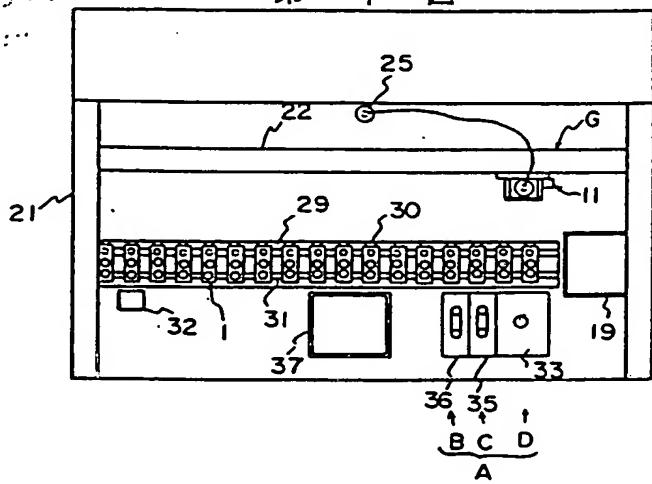
特許出願人 株式会社 クラレ
代理人弁理士 本多堅



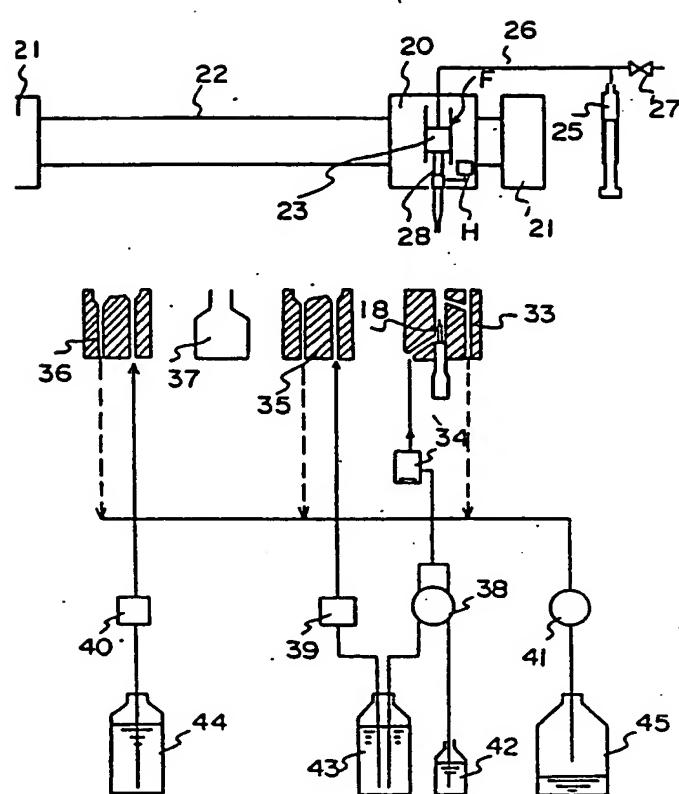
第2図



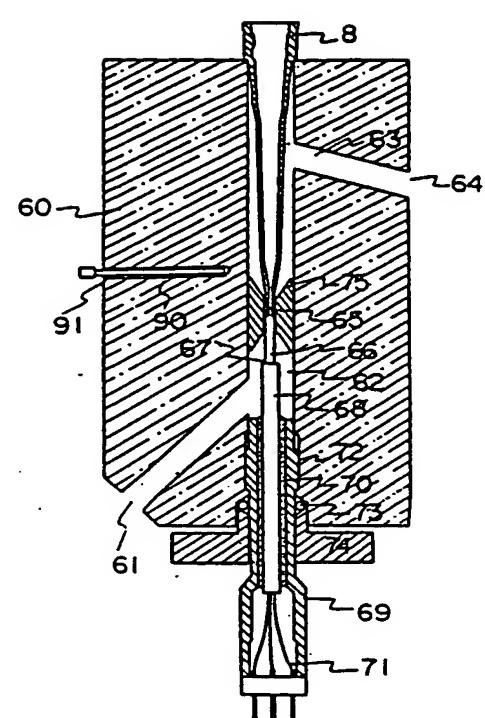
第4図



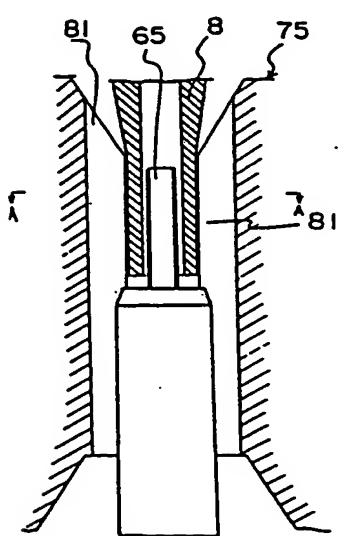
第 5 図



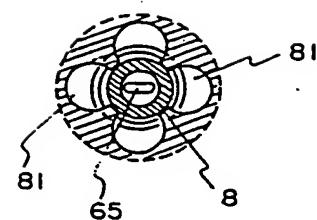
第 6 図



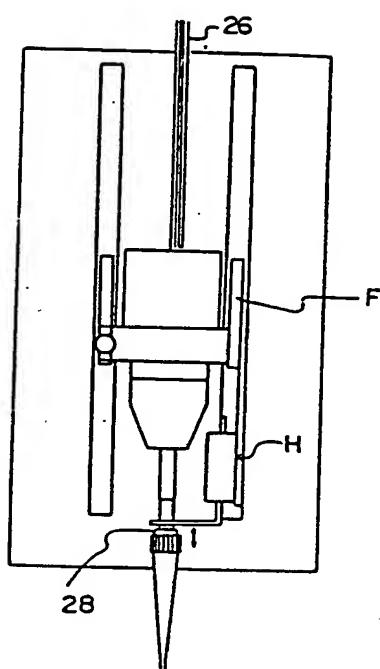
第 7 図



第 8 図

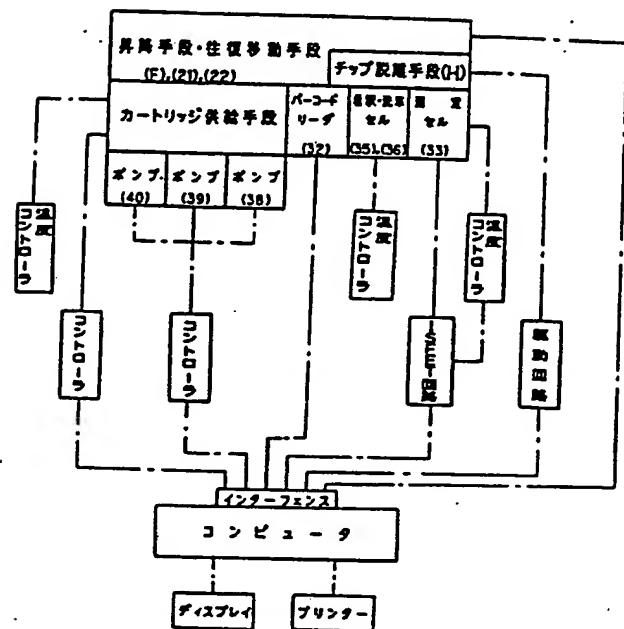


第 9 図



図面の修正(内容に変更なし)

第 10 図



手続補正書(方式)

適

平成2年4月5日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1. 事件の表示

特願平1-322886号

2. 発明の名称

酵素免疫測定用カートリッジ、それを用いた測定方法
及び測定装置

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

倉敷市酒津1621番地
(108)株式会社 クラレ

代表取締役 中村尚夫

4. 代理人

倉敷市酒津2045の1
株式会社 クラレ 内
電話 倉敷 0864(25)9325(直通)
(6747)弁理士 本多 坚
(東京連絡先)株式会社 クラレ 許部
電話 東京 03(297)9427

5. 補正命令の日付

平成2年3月27日(発送日)

6. 補正の対象

図面の第10図

7. 補正の内容

別紙のとおり(内容に変更なし)

